



## Mestrado Integrado em Medicina

Papel das aminoxídates sensíveis à semicarbazida (SSAO) na regulação da pressão arterial e do stresse oxidativo vascular e renal.

2013/2014

Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar  
Sofia de Magalhães Lima e Oliveira de Freitas



Papel das aminoxídases sensíveis à semicarbazida (SSAO) na regulação da pressão arterial e do stresse oxidativo vascular e renal.

Sofia de Magalhães Lima e Oliveira de Freitas

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador: Prof. Doutora Teresa Maria de Jesus Teixeira de Sousa

Co-orientador: Prof. Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira

2013/2014

**Título:** Papel das aminoxídates sensíveis à semicarbazida (SSAO) na regulação da pressão arterial e do stresse oxidativo vascular e renal.

Sofia Oliveira<sup>1,2</sup>, Joana Afonso<sup>1,2</sup>, Maria Paula Serrão<sup>1,2</sup>, Sónia Simão<sup>1</sup>, Manuela Morato<sup>2,3</sup>, Félix Carvalho<sup>4</sup>, António Albino-Teixeira<sup>1,2</sup>, Teresa Sousa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>2</sup> MedInUP – Centro de Investigação Farmacológica e Inovação Medicamentosa, Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>3</sup> Laboratório de Farmacologia, Departamento de Ciências do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo, 228, 4050-313, Porto, Portugal.

<sup>4</sup> REQUIMTE, Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo, 228, 4050-313, Porto, Portugal.

## 1. Abstract

Semicarbazide-sensitive amine oxidases (SSAO) metabolize amines to aldehydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> which exhibit pro-oxidant, pro-inflammatory and cytotoxic effects. Although increased SSAO activity has been associated with cardiovascular diseases, little is known about the role of SSAO-derived metabolites in hypertension. Allylamine (AA) is a SSAO substrate that has been used to induce cardiovascular lesions in experimental animals. However, its effects on blood pressure remain relatively unexplored. Therefore we aimed at evaluating the role of SSAO-derived metabolites on the regulation of blood pressure and oxidative stress in AA-treated rats.

This study was divided in 3 parts: in part I, the effects of a 28 day-treatment with AA (100 mg/kg/day) were evaluated in Sprague Dawley rats. In part II, we assessed the impact of SSAO inhibition by semicarbazide (SC, 97 mg/kg/day) in rats treated with AA for 7 days. Part III was designed to evaluate the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neutralization by polyethylene glycol (PEG)-catalase (10000 U/kg/day) in rats treated with AA for 7 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured throughout the study. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and the activity/expression of superoxide dismutase (SOD) and catalase were evaluated in the aorta and kidney. NF- $\kappa$ B and Nrf2 activation was assessed in the kidney. Urinary isoprostanes were also measured.

AA induced a marked rise in SBP which was attenuated by SC or PEG-catalase. AA increased vascular and renal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, reduced aortic and renal activity/expression of SOD and catalase, increased renal NF- $\kappa$ B activation and augmented urinary isoprostanes. Both SC and PEG-catalase reduced urinary isoprostanes in AA-treated rats. SC prevented the AA-induced increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and the changes in SOD and catalase expression. In the kidney, PEG-

catalase suppressed the AA-induced increase in NF- $\kappa$ B activation and augmented the activation of Nrf2.

We can conclude that SSAO-derived metabolites, particularly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contribute to the pathogenesis of hypertension in AA-treated rats.

Keywords: Semicarbazide-sensitive amine oxidases (SSAO); allylamine; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; hypertension; vascular and renal redox dysfunction.

## 2. Introdução

As aminoxídases sensíveis à semicarbazida (SSAO) são um grupo de enzimas localizadas na membrana plasmática de vários tecidos, nomeadamente nas células musculares lisas vasculares e adipócitos, onde são expressas em elevada quantidade, estando também presentes nos pulmões, coração, fígado, glândulas supra-renais e rins (1), (2). No plasma existe também uma forma solúvel destas enzimas que parece resultar da clivagem proteolítica das SSAO teciduais (3);(4). As SSAO diferem das monoaminoxídases (MAO) no que concerne à sua sequência de aminoácidos, localização subcelular, cofactores, substratos, inibidores específicos e funções fisiológicas (1);(3);(5). Há, no entanto, alguns substratos comuns tais como a serotonina, a triptamina, a dopamina, a tiramina e a noradrenalina (2); (1). Como o local activo das SSAO membranares se localiza no domínio extracelular e existe uma forma plasmática destas enzimas, pensa-se que uma das funções das SSAO seja a inactivação de aminas primárias potencialmente tóxicas presentes no sangue (4). Estas aminas podem ser produzidas endogenamente no decurso da actividade metabólica e catabólica ou resultar da exposição a xenobióticos, tais como o fumo do tabaco (2), (1). É de sublinhar que os produtos resultantes da actividade destas enzimas são potencialmente mais lesivos do que os substratos por elas oxidados (3, 4, 6). A desaminação oxidativa das aminas primárias pelas SSAO origina aldeídos reactivos,  $H_2O_2$  e amónia, que possuem efeitos pró-oxidantes, pró-inflamatórios e citotóxicos (3),(6),(4),(7). Deste modo, o aumento da formação destes produtos pelas SSAO, causado por exemplo por um aumento de substrato, pode contribuir para a génese e progressão de doenças, principalmente no sistema cardiovascular onde estas enzimas apresentam maior expressão (3),(6), (7). O aumento da actividade das SSAO tem sido descrito em várias condições patológicas como a diabetes, a aterosclerose e a

insuficiência cardíaca (6),(1),(7). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do aumento da actividade das SSAO e dos seus produtos enzimáticos na regulação da pressão arterial, apesar de um dos metabolitos destas enzimas, o  $H_2O_2$ , ser um reconhecido mediador de disfunção cardiovascular e renal (8), (9-12).

A alilamina (AA), um químico industrial e substrato das SSAO, tem sido usada experimentalmente para induzir lesões vasculares e miocárdicas em ratos (6, 7, 13, 14). O metabolismo da AA pelas SSAO origina acroleína,  $H_2O_2$  e amónia (15),(16). Estes produtos contribuem para as alterações estruturais e stresse oxidativo observados nos animais tratados com AA, uma vez que a semicarbazida, um inibidor das SSAO, previne estes efeitos (17),(18). Este modelo experimental tem sido útil para evidenciar o papel das SSAO e dos seus produtos enzimáticos na fisiopatologia cardiovascular. No entanto, os efeitos da AA na pressão arterial não estão ainda devidamente esclarecidos. Existem apenas três estudos que avaliam a pressão arterial em ratos tratados com AA (19),(16),(14). Embora todos descrevam a ausência de efeito pressor do tratamento crónico com AA (19), (16), (14), um deles refere um aumento tendencial da pressão arterial sistólica nos ratos tratados com esta toxina (19). É de sublinhar que nestes estudos os animais controlo apresentam valores de pressão arterial relativamente elevados ( $\geq 130$  mmHg) e que nenhum dos protocolos experimentais refere a existência de um período de habituação dos animais ao procedimento de medição da pressão arterial (19),(16), (14) . É também contraditório que o tratamento com acroleína ou o aumento de  $H_2O_2$  contribuam para a elevação da pressão arterial (20),(21), (8), (9), (22), (11), (12) mas que o tratamento com AA seja desprovido de efeito pressor apesar das alterações na reactividade e estrutura vascular (16), (23), (24).

Este trabalho pretende assim avaliar o papel das SSAO e dos seus produtos enzimáticos na regulação da pressão arterial em animais tratados com AA. Uma vez que a disfunção



renal parece ser um denominador comum de todas as formas de hipertensão arterial (25), avaliar-se-á não só o stresse oxidativo sistémico e vascular, mas também o estado redox renal. Por último, uma vez que o  $H_2O_2$  tem sido descrito como um importante agente pró-hipertensor em vários modelos experimentais (26); (9), (22), (11), (12) e está envolvido na regulação da resposta inflamatória e redox (27), (28), serão também estudados os efeitos da sua neutralização na pressão arterial e na activação de factores de transcrição pró-inflamatórios e antioxidantes em ratos tratados com AA.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais e desenho experimental**

Foram utilizados ratos macho Sprague Dawley, com um peso médio de 250-300 g, provenientes da empresa Charles River Laboratories, Espanha. Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura (21°C), humidade relativa (60%) e alternância de exposição à luz (12 horas de escuridão, 12 horas de luz) com acesso livre a água e a comida. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos das autoridades locais (ORBEA, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto) para o manuseamento de animais de laboratório e com a Directiva Europeia 2010/63/EU. Este estudo foi realizado num modelo de disfunção cardiovascular induzida pela administração de alilamina (AA) (13) e foi dividido em 3 partes. Na parte I avaliaram-se os efeitos da AA na pressão arterial e no estado redox sistémico, vascular e renal. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: ratos tratados com AA (100mg/kg/dia, em água de bebida, durante 28 dias) e ratos controlo (não tratados). Na parte II avaliaram-se os efeitos da inibição das SSAO na pressão arterial e no estado redox sistémico, vascular e renal de animais tratados com AA. Os animais foram distribuídos aleatoriamente por 3 grupos experimentais: grupo controlo (animais não tratados), grupo tratado com AA (100 mg/kg/dia, na água de bebida, do dia 0 ao dia 7) e grupo simultaneamente tratado com AA (100 mg/kg/dia, na água de bebida, do dia 0 ao dia 7) e semicarbazida (SC) (97 mg/kg/dia, i.p., do dia -7 ao dia 7). Esta dose de SC inibe as SSAO (18). Adicionalmente, em alguns animais controlo, avaliou-se também o efeito do tratamento com SC na pressão arterial. Na parte III analisaram-se os efeitos da neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na pressão arterial, no stresse oxidativo e na activação renal de factores de transcrição induzidos pelo stresse oxidativo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente por 3 grupos: grupo controlo

(não tratados), grupo tratado com AA (100 mg/kg/dia, na água de bebida, do dia 0 ao dia 7) e grupo tratado simultaneamente com AA (100 mg/kg/dia, na água de bebida, do dia 0 ao dia 7) e polietilenoglicol (PEG) catalase (10000 U/kg/dia, do dia -2 ao dia 7), uma enzima que neutraliza o  $H_2O_2$  ((29, {Sousa T, 2008 #12})). Esta dose de PEG-catalase reduziu a pressão arterial e a concentração plasmática, urinária e renal de  $H_2O_2$  em estudos *in vivo* anteriormente realizados pelo nosso grupo ((11), (12)).

### **3.2. Medição da pressão arterial**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada ao longo do estudo em ratos despertos e pré-aquecidos (38°C, 10-15 minutos) pelo método não invasivo de medição na cauda, tendo sido utilizado um detector de pulso fotoelétrico (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha). Para cada animal e cada situação experimental foram efectuadas 6 determinações consecutivas, cuja média aritmética foi utilizada para cálculos posteriores. Após um período de 7 dias de adaptação à metodologia de avaliação da PAS, seleccionaram-se apenas os animais normotensos, i.e., que apresentavam valores de pressão arterial sistólica igual ou inferior a 125 mmHg. Na parte II, foram também efectuadas medições invasivas da pressão arterial sistólica em alguns ratos controlo e tratados com AA. Para esse efeito, anestesiaram-se os ratos com uma mistura de cetamina (60 mg/kg, i.p.) e medetomidina (0,25 mg/kg, i.p.) e efectuou-se a implantação de um catéter de polietileno (PE-10) na aorta abdominal, através da artéria femoral. A extremidade distal do catéter foi unida a outro catéter (PE-50) e conduzida subcutaneamente até à região dorsal do pescoço onde foi exteriorizada. Após um período de recuperação dos animais, efectuou-se a ligação do catéter arterial a um transdutor de pressão (TRA-021, Letica, Barcelona, Espanha) e registaram-se as

medições de pressão arterial de ratos despertos e sem restrição de movimentos, num polígrafo (Unigraph 2000-5.6, Letica, Barcelona, Espanha).

### **3.3. Colheitas de urina, órgãos ou tecidos**

No penúltimo dia de cada parte do estudo (I a III), os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para possibilitar a recolha da urina de 24h. No último dia de cada parte do estudo, os ratos foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) e após perfusão com soro fisiológico recolheram-se os rins e a aorta. Efectuou-se em seguida a dissecação da aorta e dos rins. Nos rins, removeu-se a cápsula e separaram-se as regiões do córtex e medula. As amostras destinadas à avaliação do  $H_2O_2$  foram imediatamente processadas e analisadas. Na parte III, os extractos nucleares do córtex renal foram também imediatamente preparados e guardados a  $-80^{\circ}C$  até posterior análise. As urinas foram guardadas a  $-80^{\circ}C$ , tendo sido previamente adicionado o antioxidante butil-hidroxitolueno (0,005%). Todas as outras amostras de vasos e rins foram armazenadas a  $-80^{\circ}C$  até posterior avaliação.

### **3.4. Avaliação da produção de $H_2O_2$**

A produção de  $H_2O_2$  foi avaliada na aorta, na medula renal e no córtex renal. Cada tecido de cada animal foi incubado separadamente num tubo contendo meio Krebs-HEPES (mM: NaCl 118, KCl 4,5,  $CaCl_2$  2,5,  $MgCl_2$  1,2,  $KH_2PO_4$  1,2, Na-HEPES 25,  $NaHCO_3$  25 e glucose 5; pH 7,4), com oxigenação e a  $37^{\circ}C$ . Após um período de incubação de noventa minutos para as aortas ou de sessenta minutos para as medulas e córtexes renais, recolheram-se alíquotas de 50  $\mu$ l, em duplicado, do meio de incubação de cada tecido e quantificou-se a concentração de  $H_2O_2$  por espectrofluorimetria, utilizando o kit Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay (Molecular Probes, Life

Technologies, Carcavelos, Portugal). Os resultados foram depois normalizados para o conteúdo em proteína de cada amostra.

### **3.5. Avaliação da actividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase**

A actividade da SOD e da catalase foi avaliada na aorta, medula e córtex renais, de acordo com metodologias previamente descritas(11).

### **3.6. Quantificação das proteínas totais**

O conteúdo em proteínas totais das amostras foi quantificado pelo método de Bradford, com o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Amadora, Portugal).

### **3.7. Análise da expressão proteica da SOD e da catalase**

A expressão proteica da SOD-1, SOD-2 e catalase foi avaliada na aorta e no córtex renal, de acordo com uma metodologia previamente descrita (30).

### **3.8. Quantificação dos isoprostanos urinários**

Os isoprostanos (designados por 8-isoprostanos, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ou 15-isoprostanos F<sub>2t</sub>) são isómeros da PGF<sub>2α</sub> formados principalmente pela peroxidação do ácido araquidónico catalizada por espécies reativas de oxigénio e são amplamente reconhecidos e utilizados como biomarcadores de stresse oxidativo ( (31)). Os isoprostanos foram quantificados na urina de 24h por um ensaio imunoenzimático, utilizando um kit comercial (Urinary Isoprostane ELISA kit, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, EUA). Os resultados foram normalizados para o conteúdo em creatinina urinária quantificado num analisador bioquímico automático, de acordo com o método de Jaffé.

### **3.9. Avaliação da activação do factor de transcrição nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e do factor nuclear 2 relacionado com o factor nuclear eritróide 2 (Nrf2)**

O NF- $\kappa$ B e o Nrf2 são factores de transcrição que regulam, respectivamente, a expressão de genes pró-inflamatórios ou genes envolvidos na resposta antioxidante. A activação destes factores é induzida pelo stresse oxidativo e pode ser modulada por antioxidantes ((32), (33)). A activação do NF- $\kappa$ B e do Nrf2 foi analisada na Parte III do estudo, em extractos nucleares de córtex renal. Estes extractos foram preparados imediatamente após a colheita e dissecação dos rins, de acordo com uma metodologia previamente descrita ((34)). A activação do NF- $\kappa$ B e do Nrf2 foi depois avaliada por ensaios imunoenzimáticos usando kits comerciais (TransAM, NF- $\kappa$ B p65, Active Motif Europe, Rixensart, Bélgica; TransAM, Nrf2, La Hulpe, Bélgica).

### **3.10. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.), sendo o  $n$  correspondente ao número de ratos por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste  $t$  de Student para valores não emparelhados, quando se pretendia comparar resultados referentes a 2 grupos. Para comparação de resultados envolvendo 3 ou mais grupos, recorreu-se ao teste ANOVA para comparações múltiplas, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Foram considerados significativos os valores de  $p$  inferiores a 0,05.

## **4. Resultados**

### **4.1 Parte I**

#### **4.1.1 Efeito da AA na pressão arterial**

O tratamento com AA durante 28 dias provocou um aumento significativo da pressão arterial sistólica (PAS) ( $159 \pm 5$  mmHg) quando comparado com o grupo controlo ( $127 \pm 2$  mmHg) ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1). Esta elevação da PAS foi evidenciada a partir do terceiro dia de tratamento com a AA (Fig. 1).

#### **4.1.2. Efeito da AA na produção vascular e renal de $H_2O_2$**

O tratamento com AA durante 28 dias aumentou significativamente a produção de  $H_2O_2$  na aorta (Fig. 2A) e no córtex renal (Fig. 2C), mas não na medula renal (Fig. 2B).

#### **4.1.3 Actividade da SOD e catalase**

A actividade da SOD estava significativamente reduzida na aorta (Fig. 3A) e no córtex renal (Fig. 3B) e aumentada na medula renal (Fig. 3C) dos animais tratados com AA durante 28 dias. A actividade da catalase estava diminuída na aorta (Fig. 4A), inalterada no córtex renal (Fig. 4B) e aumentada na medula renal (Fig. 4C) dos animais tratados com AA.

#### **4.1.4 Excreção urinária de isoprostanos**

O tratamento com AA durante 28 dias aumentou significativamente a excreção urinária de isoprostanos (Fig. 5).

## **4.2 Parte II**

### **4.2.1 Efeito da inibição das SSAO na pressão arterial**

O tratamento com AA durante 7 dias aumentou significativamente a PAS, comparativamente com o grupo controlo ( $161 \pm 3$  mmHg vs  $122 \pm 2$  mmHg,  $p < 0,05$ ) (Fig. 6A). O tratamento com a SC preveniu a elevação da PAS induzida pela AA ( $128 \pm 2$  mmHg,  $p < 0,05$  vs AA) mas não alterou a pressão arterial dos animais controlo ( $118 \pm 5$  mmHg) (Fig. 6A). Nas nossas condições experimentais, verificou-se ainda uma correlação significativa ( $r = 0,9995$ ,  $r^2 = 0,9991$ ,  $p = 0,0194$ ) entre os valores de PAS avaliados pelo método de medição da pressão arterial na cauda e os valores de PAS avaliados pelo método de medição intra-arterial (Fig. 6B).

### **4.2.2 Efeito da inibição das SSAO na produção de $H_2O_2$**

O tratamento com AA durante 7 dias aumentou significativamente a produção de  $H_2O_2$  na aorta (Fig. 7A) e no córtex renal (Fig. 7B). O tratamento com SC preveniu o aumento da produção de  $H_2O_2$  induzido pela AA, quer na aorta quer no córtex renal (Figs. 7A e 7B).

### **4.2.3. Efeito da inibição das SSAO na expressão proteica de enzimas antioxidantes**

O tratamento com AA durante 7 dias não alterou a expressão da SOD-1 na aorta (Fig. 8A) mas reduziu significativamente a expressão da SOD-1 (Fig. 8B) e da SOD-2 no córtex renal (Fig. 8C). O tratamento com SC não alterou a expressão da SOD-1 na aorta (Fig. 8A) nem no córtex renal (Fig. 8B), mas preveniu a diminuição da expressão renal da SOD-2 induzida pela AA (Fig. 8C). O tratamento com AA reduziu significativamente a expressão da catalase na aorta (Fig. 9A). Este efeito foi prevenido



pelo tratamento com SC (Fig. 9A). A expressão da catalase no córtex renal não foi afectada nem pelo tratamento com AA, nem pelo tratamento com SC+AA (Fig 9B).

#### **4.2.4 Efeito da inibição das SSAO na excreção urinária de isoprostanos**

O tratamento com AA durante 7 dias aumentou significativamente a excreção urinária de isoprostanos (Fig. 10). O tratamento com SC preveniu o aumento da excreção de isoprostanos induzido pela AA (Fig. 10).

### **Parte III**

#### **4.3.1 Efeito da neutralização do $H_2O_2$ na pressão arterial**

Tal como observado na parte II, o tratamento com AA durante 7 dias aumentou significativamente a PAS, comparativamente com os animais controlo ( $165 \pm 1,03$  mmHg vs  $117 \pm 0,53$  mmHg,  $p < 0,05$ ) (Fig.11). A administração de PEG-catalase preveniu a elevação da PAS nos ratos tratados com AA ( $136 \pm 0,63$  mmHg,  $p < 0,001$  vs AA) (Fig.11), mas não alterou a PAS dos animais controlo ( $125 \pm 1,38$  mmHg).

#### **4.3.2 Efeito da neutralização do $H_2O_2$ na excreção urinária de isoprostanos**

Tal como observado na parte III, o tratamento com AA durante 7 dias aumentou significativamente a excreção urinária de isoprostanos, comparativamente com os animais controlo (Fig. 12). A administração de PEG-catalase atenuou significativamente a elevação da excreção urinária de isoprostanos nos ratos tratados com AA (Fig. 12).

#### **4.3.3 Activação do NF- $\kappa$ B e do Nrf2 no córtex renal**

O tratamento com AA aumentou significativamente a activação do NF- $\kappa$ B (Fig. 13A), mas não do Nrf2 (Fig. 13B), no córtex renal. Por sua vez, a administração de PEG-

catalase suprimiu a activação do NF- $\kappa$ B (Fig. 13A) e aumentou marcadamente a activação do Nrf2 (Fig. 13B) no córtex renal dos animais tratados com AA.

## 5. Discussão

Este estudo demonstra que o tratamento crónico com AA, um substrato das SSAO, promove o desenvolvimento de hipertensão arterial. Nas nossas condições experimentais, os animais tratados com AA apresentaram uma elevação marcada da pressão arterial (40 a 50 mmHg) ao fim de 7 ou 28 dias de tratamento. A discrepância entre os nossos resultados e os de estudos anteriores pode dever-se a vários factores. Em primeiro lugar, é de sublinhar que todos os animais do nosso estudo foram previamente submetidos a um período de 7 dias de adaptação à metodologia de medição não invasiva da pressão arterial, tendo sido seleccionados para avaliação apenas os animais com PAS  $\leq 125$  mmHg. Estas condições são importantes para minimizar os erros de medição associados ao stresse induzido pelos procedimentos experimentais, nomeadamente a restrição de movimentos e o aquecimento do animal (35), (36), (37), (38). Em estudos anteriores de avaliação do efeito da AA na pressão arterial, os autores não referem a existência de um período de habituação dos animais à metodologia de medição da pressão arterial e descrevem valores relativamente elevados de PAS ( $\geq 130$  mmHg) para os animais controlo (19), (16), (14). O stresse dos animais poderá então ser uma justificação para o facto de nessas avaliações não se terem observado diferenças entre os ratos controlo e os tratados com AA (19), (16), (14). Por outro lado, em dois destes estudos, a pressão arterial foi sempre avaliada 18-22h após a administração de AA (100 mg/kg) por gavagem (16), (14), ou seja, num período em que a AA e os seus metabolitos poderiam já ter sido eliminados. Pelo contrário, no nosso estudo, como os animais ingeriram a AA (100 mg/kg) na água de bebida ao longo de cada dia de tratamento, é expectável que a AA e os seus metabolitos estivessem presentes no organismo dos animais durante o período de medição da pressão arterial. De facto, noutro estudo em que a AA também foi administrada na água de bebida, foi observado

um aumento tendencial da pressão arterial nos grupos tratados com AA apesar de a dose ingerida por esses animais ter sido inferior à utilizada no nosso trabalho, uma vez que a concentração da solução de AA (0,1%) não foi ajustada ao volume consumido diariamente pelos animais de modo a administrar 100 mg/kg/dia de AA (19). É ainda de sublinhar que, no nosso estudo, foram efectuadas medições intra-arteriais da pressão arterial em alguns animais (controlo e tratados com AA) para confirmar os valores de PAS obtidos pelo método não invasivo de medição na cauda, tendo sido observada uma correlação positiva significativa entre os dois métodos.

A hipertensão arterial induzida pela AA foi acompanhada pela elevação do stresse oxidativo sistémico e alterações redox vasculares e renais, tais como o aumento da produção de  $H_2O_2$  e a diminuição da actividade e/ou expressão de defesas antioxidantes enzimáticas. A inibição das SSAO pela SC preveniu quer a elevação da pressão arterial, quer as alterações redox sistémicas, vasculares e renais. Isto sugere que a hipertensão arterial causada pela AA resulta de uma disfunção redox induzida pelos metabolitos desta amina, nomeadamente a acroleína e o  $H_2O_2$ .

O stresse oxidativo induzido pela acroleína pode resultar da depleção de antioxidantes e/ou aumento da actividade enzimática pró-oxidante. A exposição à acroleína aumenta a actividade da enzima glutathione-S-transferase, contribuindo para a diminuição do conteúdo celular de glutathione (20). Por outro lado, a acroleína induz também a activação da enzima pró-oxidante NADPH oxídase, aumentando a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (39). Estas condições tornam as células mais vulneráveis a este aldeído que acaba por danificar as proteínas, lípidos e ácido desoxirribonucleico devido à oxidação e/ou formação de complexos covalentes irreversíveis com estas moléculas (40),(20),(41). Foi recentemente demonstrado que a produção de ROS induzida pela acroleína promove a formação de ligações cruzadas entre as subunidades

da SOD-1, reduzindo a detecção da sua expressão e a actividade desta enzima (42). É provável que a diminuição da actividade e/ou expressão das enzimas SOD-1, SOD-2 e catalase observada nos ratos tratados com AA seja causada por um mecanismo semelhante. Além disso, como a acroleína promove a inactivação de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (43),(44), a redução da expressão da SOD-2 pode também resultar de uma adaptação à inibição da actividade mitocondrial. A acroleína exerce ainda efeitos na reactividade vascular e pressão arterial. O tratamento *in vitro* com acroleína ou AA induz a hipercontractilidade de artérias coronárias humanas (43), e a administração de acroleína durante 7 dias a ratos Sprague Dawley provoca uma elevação significativa da pressão arterial, acompanhada por um aumento da vasoconstrição, diminuição da disponibilidade de monóxido de azoto (NO) e aumento da peroxidação lipídica (20).

O  $H_2O_2$  pode também contribuir para a disfunção redox. A sua reacção com o radical superóxido ou com metais de transição (e.g.  $Fe^{2+}$ ) origina o radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), um agente oxidante muito potente (45); (46). O  $H_2O_2$  é também um substrato para a formação de outras ROS (e.g. ácido hipocloroso) pela mieloperoxidase (47), (12). Estes oxidantes formados a partir do  $H_2O_2$  são potentes indutores de oxidação lipídica (45); (46); (47, 48). Concentrações elevadas de  $H_2O_2$  podem também inibir ou inactivar as enzimas antioxidantes SOD e catalase (49), (50), (51), agravando o stresse oxidativo. O  $H_2O_2$  tem ainda a capacidade de amplificar a sua própria produção pela activação de várias enzimas pró-oxidantes como a NADPH oxidase, a xantina oxidase, as oxidases mitocondriais e a forma desacoplada da sintetase endotelial do NO (52),(10).

O aumento da produção de  $H_2O_2$  na aorta e córtex renal parece ser um importante denominador da hipertensão arterial nos ratos tratados com AA. Há evidência crescente de que o  $H_2O_2$  é um mediador parácrino da disfunção cardiovascular e renal(10),

(9),(12) e que contribui para a génese e progressão da hipertensão arterial por vários mecanismos, entre os quais o aumento da vasoconstrição (53), (54), (55), (56) e a diminuição da natriurese (8),(57). O facto de o tratamento com PEG-catalase ter atenuado significativamente a elevação da pressão arterial e a peroxidação lipídica nos ratos tratados com AA sublinha mais uma vez o papel do  $H_2O_2$  na patogénese da hipertensão arterial.

Um dos aspectos mais interessantes do  $H_2O_2$  é a sua capacidade de funcionar como um mediador da sinalização celular dada a sua difusibilidade inter- e intracelular e relativa estabilidade em comparação com outras espécies oxidantes (52),(10). No rim, a regulação da transcrição de genes envolvidos na inflamação ou na resposta antioxidante é particularmente relevante no contexto da hipertensão arterial uma vez que a inflamação e stresse oxidativo renais estão envolvidos na génese e perpetuação desta patologia (58),(59). O aumento da activação do NF- $\kappa$ B no córtex renal dos ratos tratados com AA e a sua supressão pela PEG-catalase sugerem que o  $H_2O_2$  é um importante mediador de disfunção renal neste modelo. A activação do NF- $\kappa$ B pelo  $H_2O_2$  pode contribuir não só para o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (60), (61) mas também para a expressão de genes relacionados com a activação do sistema renina-angiotensina intra-renal (62), (12),(63) e a desregulação da resposta natriurética (64). Por outro lado, o NF- $\kappa$ B parece estar também directamente envolvido na regulação do Nrf2 uma vez que a supressão do NF- $\kappa$ B nuclear pela PEG-catalase foi acompanhada por um aumento marcado da activação do Nrf2 no córtex renal dos ratos tratados com AA. De facto, alguns estudos recentes descrevem uma regulação coordenada e inversa destes factores de transcrição (65), (66). Podemos então considerar que, neste modelo, a PEG-catalase exerce um efeito protector renal quer pela inibição da sinalização pró-inflamatória, quer pelo aumento das defesas celulares uma

vez que o Nrf2 regula a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante e na eliminação de xenobióticos (33).

Este trabalho evidencia o papel das SSAO e dos seus metabolitos na patogénese da hipertensão arterial. Embora a relevância fisiopatológica do modelo da AA possa ser questionada pelo facto desta amina não ser um substrato endógeno das SSAO, existem várias condições associadas ao aumento da disponibilidade de substratos e/ou da actividade metabólica destas enzimas e consequente elevação da produção de  $H_2O_2$  e aldeídos reactivos. Por exemplo, na diabetes parece haver um aumento da concentração do substrato metilamina e da actividade das SSAO (7),(67),(68),(69). A metilamina está também presente no fumo do tabaco e é um metabolito da adrenalina, sendo por isso provável que a sua disponibilidade aumente em fumadores e em indivíduos sujeitos a situações de stresse ((3). É de realçar que o fumo do tabaco contém não só metilamina mas também acroleína (39). A exposição a aldeídos tóxicos, ou a substratos envolvidos na sua produção, poderá explicar a elevada associação entre tabagismo e doença cardiovascular (39), (70). Há ainda outras condições patológicas onde se verifica um aumento da actividade das SSAO tais como a obesidade, a insuficiência cardíaca, a cardiopatia hipertensiva, a aterosclerose e a cirrose hepática (71), (3), (2),(69).

A relação entre o  $H_2O_2$  produzido por estas enzimas e a regulação cardiovascular e renal é particularmente interessante do ponto de vista terapêutico. De facto, estudos anteriores sugerem que o efeito anti-hipertensor da hidralazina se deve, pelo menos em parte, à inibição das SSAO e consequente redução da produção vascular de  $H_2O_2$  (72), (73). Outros autores propõem ainda que a inibição das SSAO pela hidralazina possa ser útil para prevenir a lesão vascular em doentes com diabetes ou insuficiência cardíaca (3). O nosso estudo sugere ainda que a redução do  $H_2O_2$  produzido pelas SSAO pode prevenir a disfunção renal causada pela activação do NF- $\kappa$ B.

Podemos então concluir que os metabolitos das SSAO causam alterações redox sistémicas, vasculares e renais que contribuem para o desenvolvimento de hipertensão arterial, e que a inibição destas enzimas ou a neutralização dos seus produtos poderão ser estratégias importantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e renais.

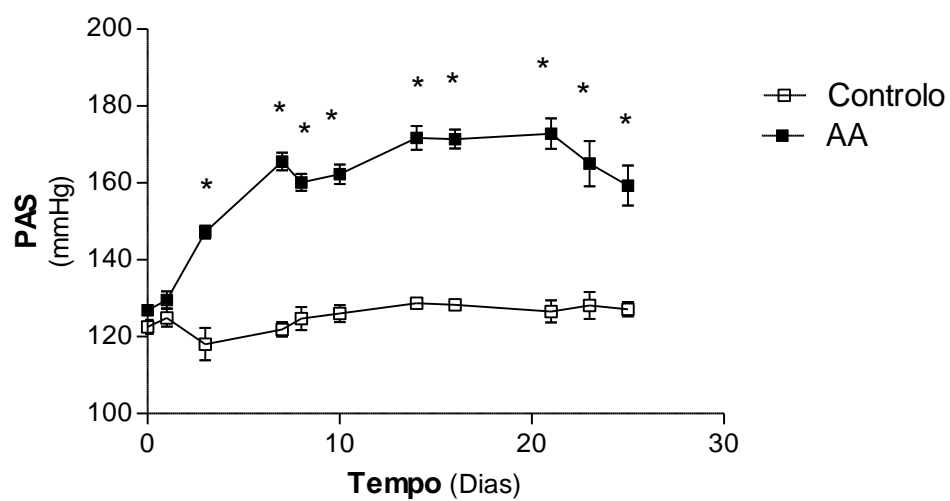


## **6. Agradecimentos**

Agradece-se ao Departamento de Doenças Renais, Urológicas e Infecciosas a disponibilidade para utilizar os seus equipamentos para a realização deste trabalho.

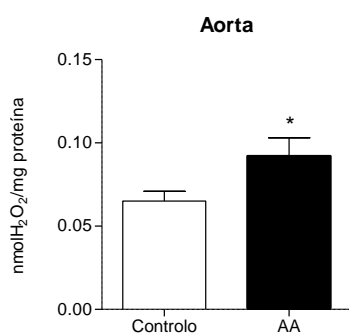
## 7. Figuras

Figural

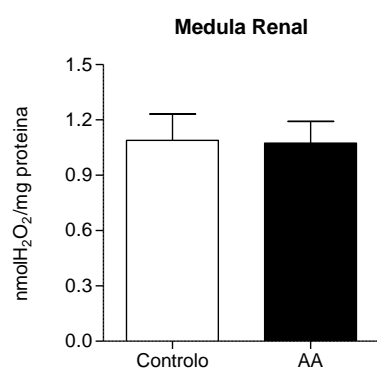


**Figura 2**

**A**



**B**



**C**

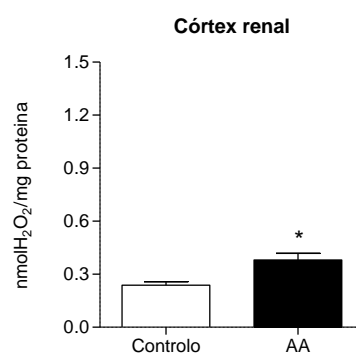
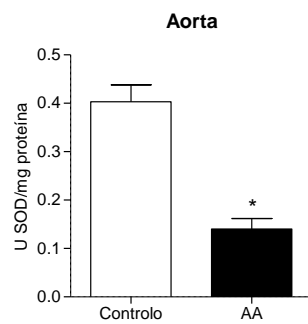
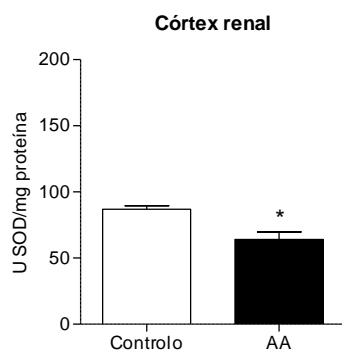


Figura 3

**A**



**B**



**C**

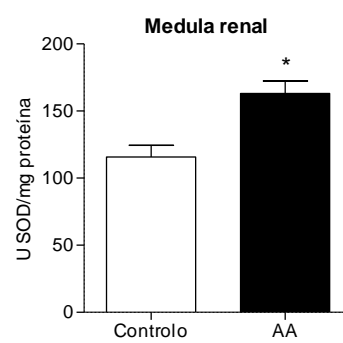


Figura 4

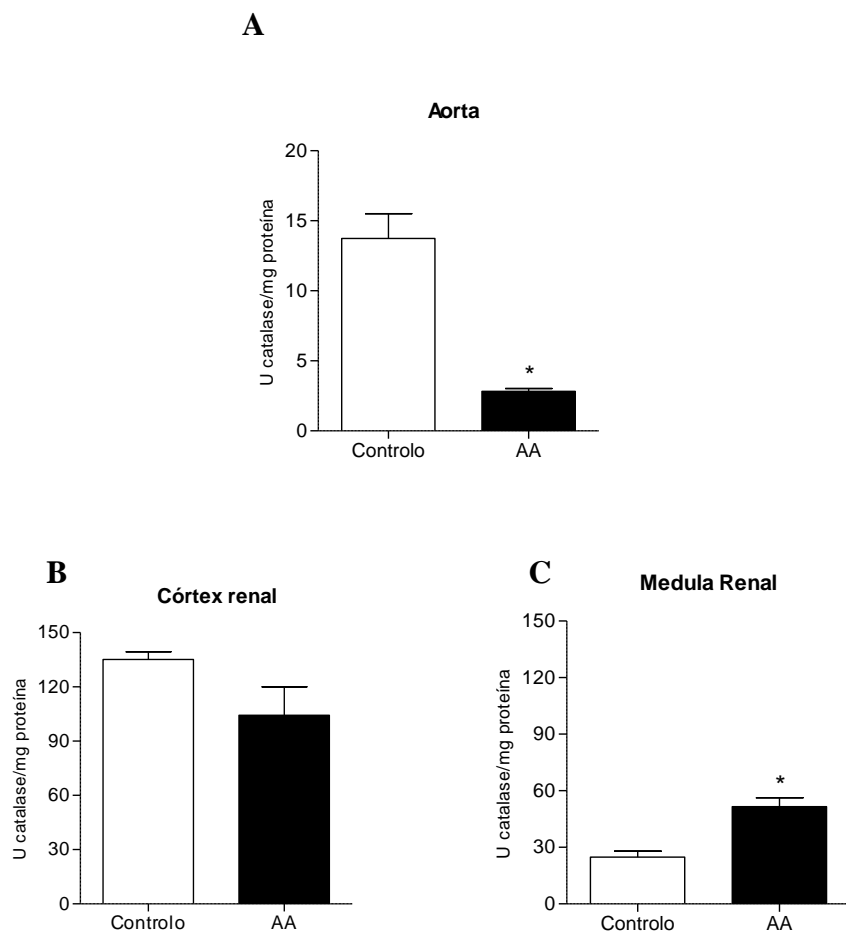


Figura 5

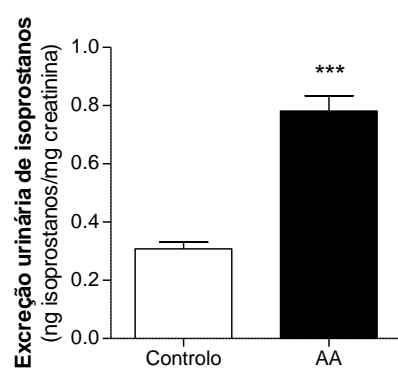
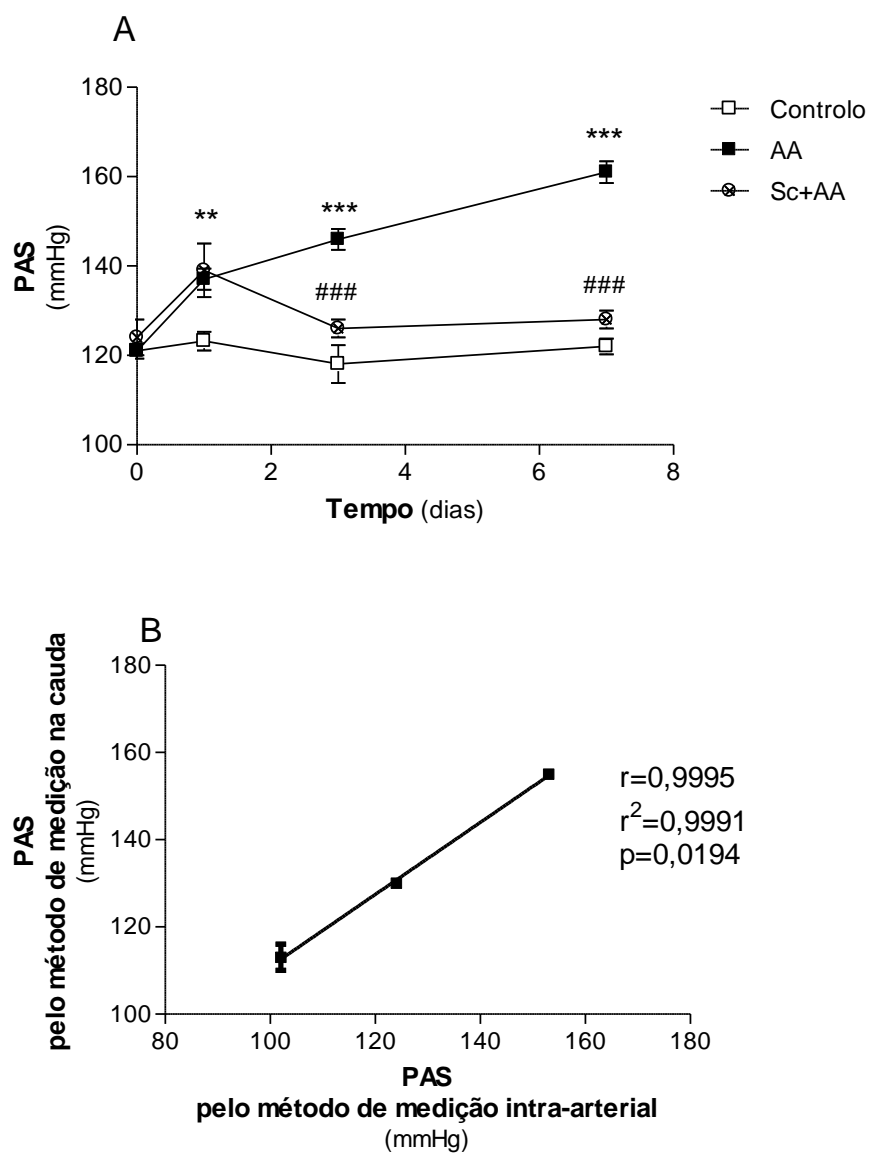
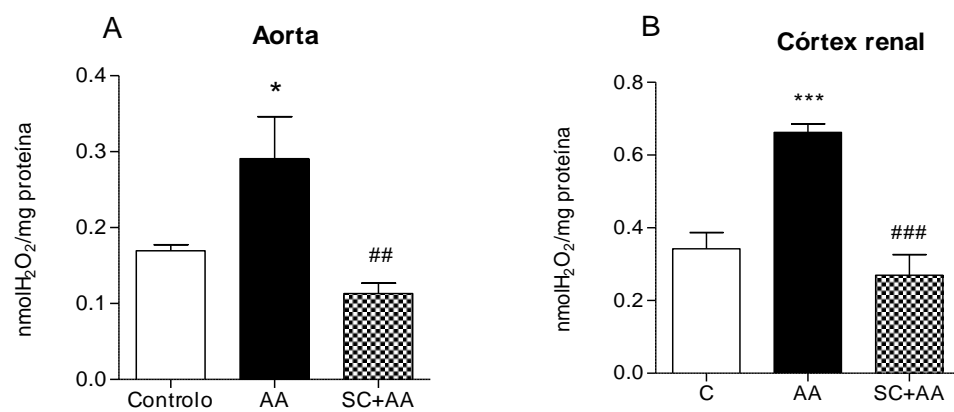


Figura 6

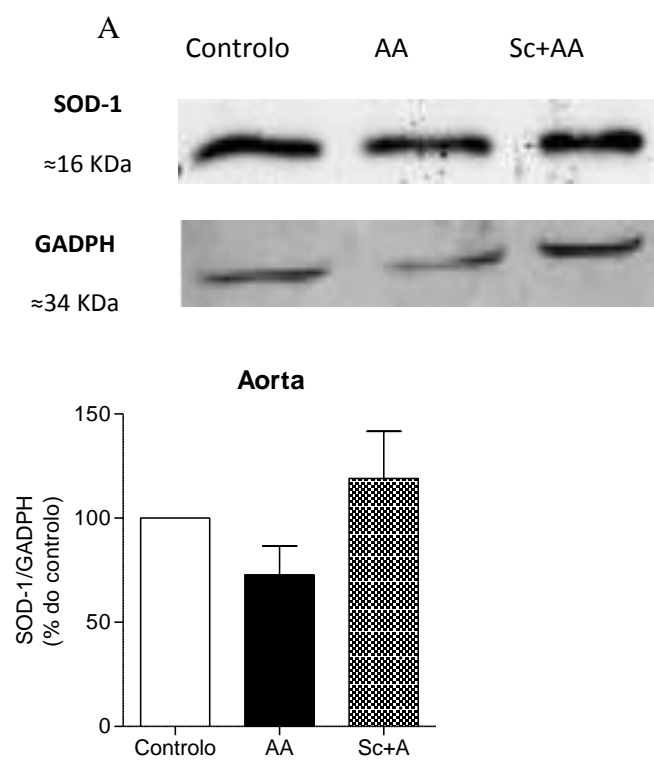


**Figura 7**





**Figura 8**



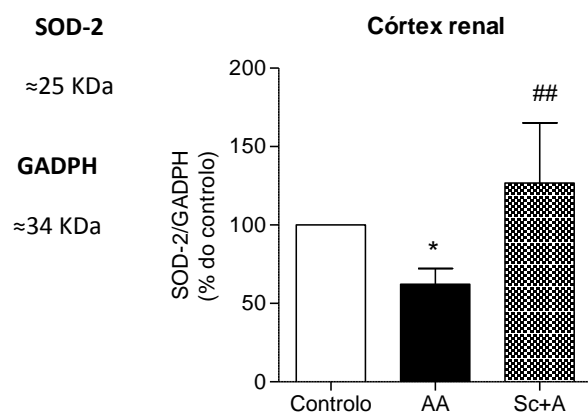
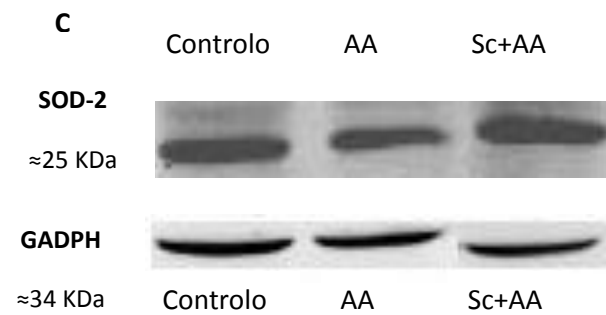
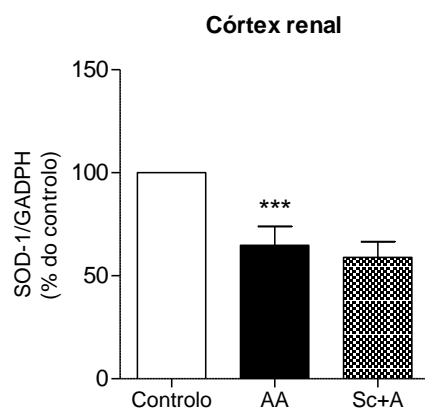
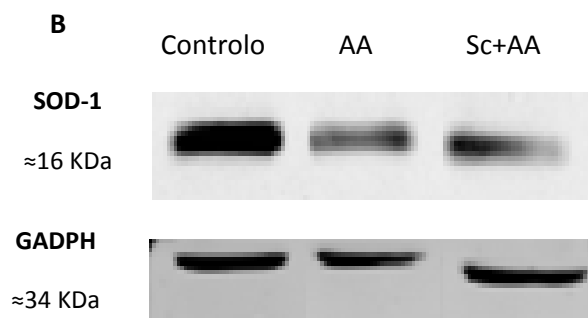


Figura 9

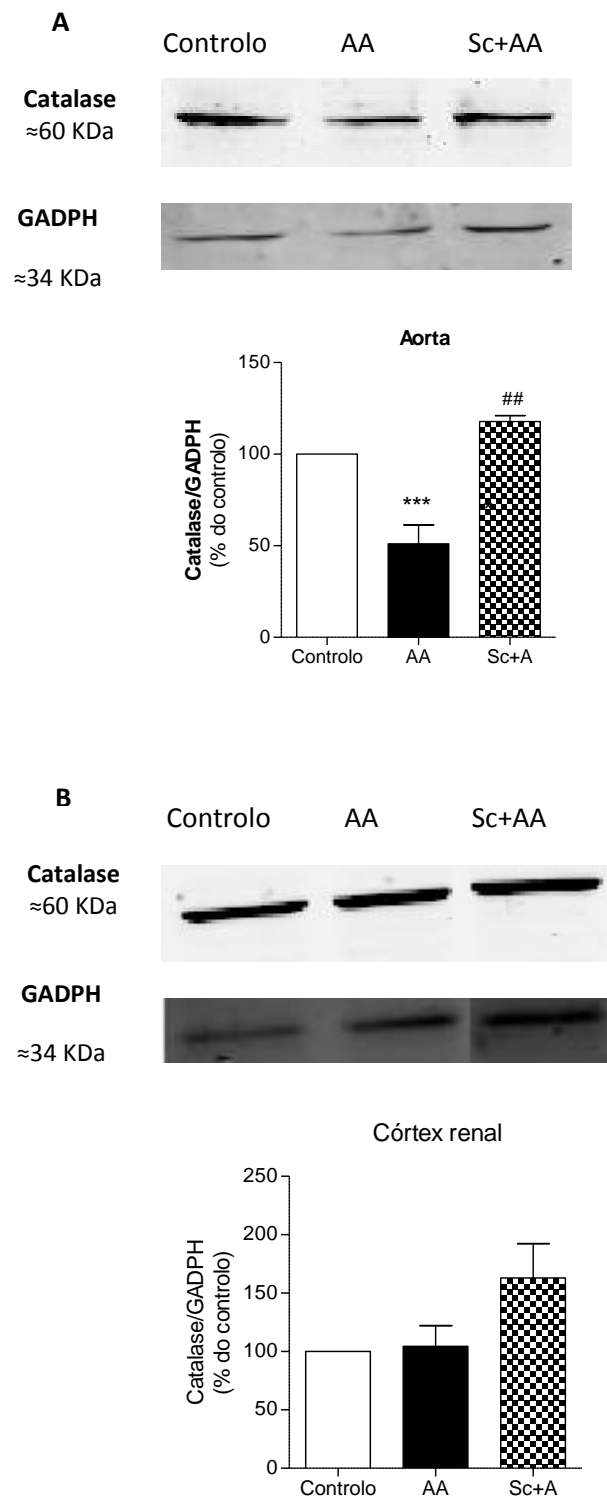


Figura 10

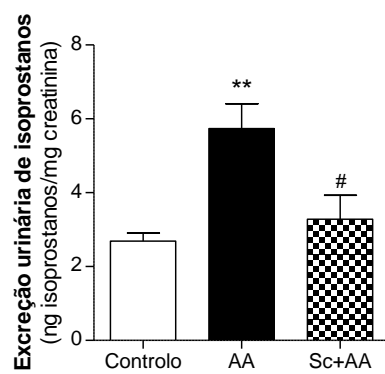


Figura 11

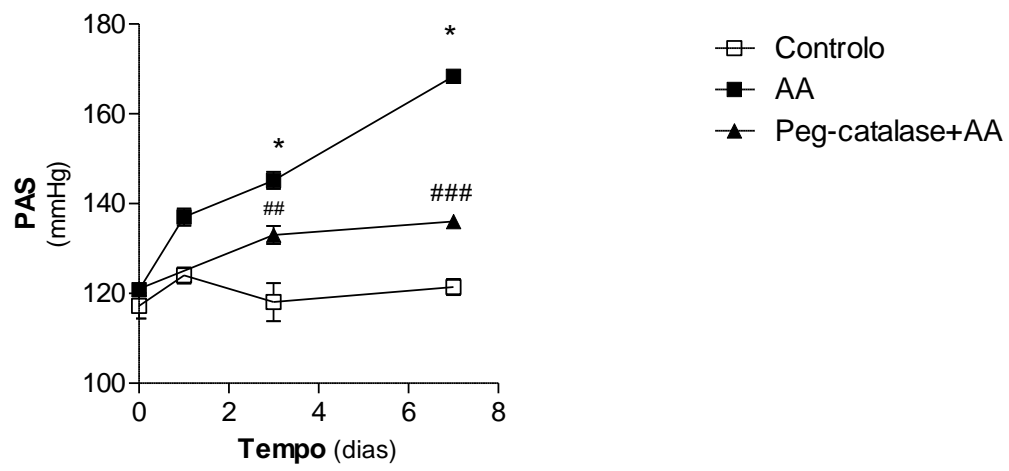


Figura 12

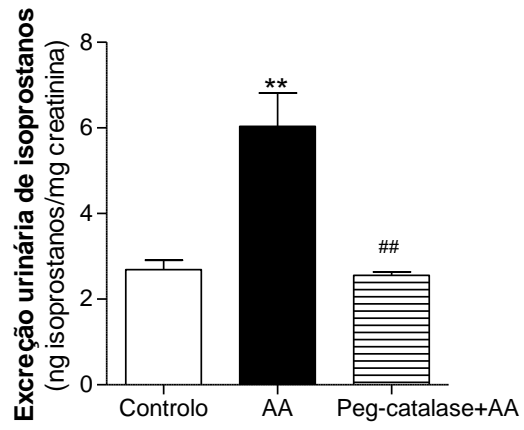
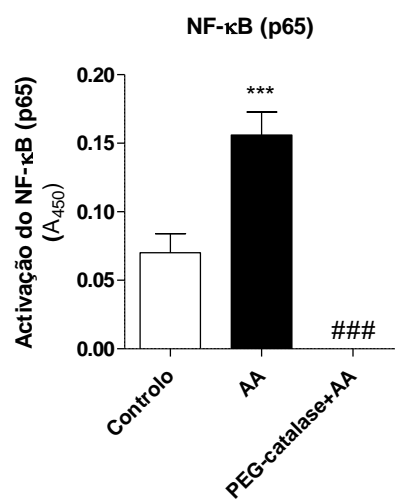
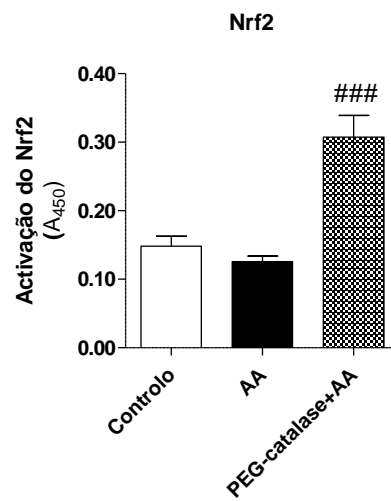


Figura 13

A



B



## 8. Legendas das Figuras

**Fig. 1:** Pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) em ratos controlo e ratos tratados com AA durante 28 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M., n=6-13, \* $p < 0.05$  vs controlo.

**Fig. 2** Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ratos controlo e em ratos tratados com AA durante 28 dias: (A) aorta; (B) medula renal; (C) córtex renal. Os resultados são expressos como média  $\pm$ S.E.M., n=10-12; \* $p < 0,05$  vs controlo.

**Fig. 3** Actividade da SOD em ratos controlo e em ratos tratados com AA durante 28 dias: (A) aorta (n=5); (B) córtex renal (n=7-10); (C) medula renal (n=8-9). Os resultados são expressos como média  $\pm$ S.E.M.; \* $p < 0,05$  vs controlo.

**Fig. 4** Actividade da catalase em ratos controlo e em ratos tratados com AA durante 28 dias: (A) aorta (n=5); (B) córtex renal (n=7-10); (C) medula renal (n=8-9). Os resultados são expressos como média  $\pm$ S.E.M.; \* $p < 0,05$  vs controlo.

**Fig. 5:** Excreção urinária de isoprostanos em ratos controlo e em ratos tratados com AA durante 28 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M., n=12; \*\*\* $p < 0,001$  vs controlo.

**Fig. 6** Pressão arterial sistólica (PAS): (A) Evolução da PAS em ratos controlo, em ratos tratados com AA durante 7 dias e em ratos tratados com SC+AA. (B) correlação entre os valores de PAS avaliados pelo método não invasivo de medição na cauda e os valores de PAS obtidos por medição intra-arterial. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M., n= 4-6 \*\* $p < 0,01$  vs controlo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs controlo; ###  $p < 0,001$  vs AA.



**Fig. 7** Produção de  $H_2O_2$  em ratos controle, ratos tratados durante 7 dias com AA e ratos tratados com SC+AA: (A) aorta; (B) córtex renal. Os resultados são expressos como média±S.E.M., n=4-5; \*  $p < 0,05$  vs controle, \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle, ##  $p < 0,01$  vs AA, ###  $p < 0,001$  vs AA.

**Fig. 8** Expressão proteica da SOD em ratos controle, ratos tratados com AA durante 7 dias e ratos tratados com SC+AA: (A) SOD-1 na aorta (n= 5 - 6 ); (B) SOD-1 no córtex renal (n= 5 - 6); (C) SOD-2 no córtex renal (n=3 - 6). São apresentadas fotografias representativas dos *blots* analisados e respectiva representação gráfica da média±S.E.M. de cada grupo. Os resultados foram expressos em % do grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; #  $p < 0,05$  · ## $p < 0,01$  vs AA.

**Fig. 9** Expressão proteica da catalase em ratos controle, ratos tratados com AA durante 7 dias e ratos tratados com SC+AA: (A) aorta (n= 3 - 6 ); (B) córtex renal (n=5-6). São apresentadas fotografias representativas dos *blots* analisados e respectiva representação gráfica da média±S.E.M. de cada grupo. Os resultados foram expressos em % do grupo controle. Os resultados foram expressos em % do grupo controle. \*\*\* $p < 0,001$  vs controle. ## $p < 0,01$  vs AA.

**Fig. 10** Excreção urinária de isoprostanos em ratos controle, ratos tratados com AA durante 7 dias e ratos tratados com SC+AA. Os resultados são expressos como média±S.E.M., n=3-5; \*\* $p < 0,01$  vs controle, #  $p < 0,05$  vs AA.

**Fig. 11** Evolução da PAS em ratos controle, em ratos tratados com AA durante 7 dias e em ratos tratados com Peg-catalase+AA. Os resultados são expressos como média±S.E.M., n=4-5, \* $p < 0,05$  vs controle; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs AA.

**Fig. 12** Excreção urinária de isoprostanos em ratos controlo, ratos tratados com AA durante 7 dias e ratos tratados com PEG-catalase+AA. Os resultados são expressos como média±S.E.M., n=4; \*\* $p < 0,01$  vs controlo; ## $p < 0,01$  vs AA.

**Fig. 13** Activação do NF- $\kappa$ B (A) e do Nrf2 (B) no córtex renal de ratos controlo, ratos tratados com AA durante 7 dias e ratos tratados com PEG-catalase+AA. Resultados expressos como média±S.E.M., n=4-6. \*\*\* $p < 0,001$  vs controlo; ### $p < 0,001$  vs AA.

## 9. Referências

1. Marinho C, Arduíno, D., Falcão, L.M., Bicho, M. Alterações da actividade da amina oxidase sensível à semicarbazida plasmática na cardiopatia hipertensiva com disfunção sistólica ventricular esquerda. *Rev Port Cardiol*. 2010;29:37-47.
2. Boomsma F BU, van der Houwen AM, van den Meiracker AH. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase in human (patho)physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1647:48–54.
3. Boomsma F vVD, de Kam PJ, Man in't Veld AJ, Mosterd A, Lie KI, Schalekamp MA. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 1997;33:387-91.
4. O'Sullivan J, Unzeta, M., Healy, J., O'Sullivan, M. I., Davey, G. & Tipton, K. F. . Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *NeuroToxicology*. 2004;25:303–15.
5. S Tohka ML, S Jalkanen, M Salmi. Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment in vivo. *FASEB*. 2001;15:373-82.
6. Yu PH WS, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1647(1-2):193-9.
7. K. Magyar ZM, and P. Mátyus. Semicarbazide-sensitive amine oxidase. Its physiological significance. *Pure Appl Chem*. 2001;73(9):1393-400.
8. Chen YF CAJ, Zou AP. Increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R827–R33.

9. Makino A SM, Zou AP, Cowley AW Jr , 25–30. Increased renal medullary H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to hypertension. *Hypertension* 2003;42::25-30.
10. Ardanaz N PP, . Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231: 237–51.
11. Sousa T PD, Morato M, Marques-Lopes J, Fernandes E, Afonso J, et al. . Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2008;588:267–76.
12. T Sousa SO, J Afonso, M Morato, D Patinha, S Fraga, F Carvalho and A Albino-Teixeira. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II. *British Journal of Pharmacology* 2012;166:2386–401.
13. Boor PJ HR. Allylamine cardiovascular toxicity. *Toxicology*. 1987;44(2):129-45.
14. Conklin DJ TM, Boor PJ. The role of plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase in allylamine and b-aminopropionitrile cardiovascular toxicity: mechanisms of myocardial protection and aortic medial injury in rats. *Toxicology*. 1999;138(3):137-54.
15. Nelson TJ, Boor, P.J. Allylamine cardiotoxicity--IV. Metabolism to acrolein by cardiovascular tissues. *Biochem Pharmacol*. 1982;31(4):509-14.
16. Conklin DJaB, P.J. Allylamine Cardiovascular Toxicity: Evidence for Aberrant Vasoreactivity in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;148:245–51.
17. Boor PJ NT. Allylamine cardiotoxicity: III. Protection by semicarbazide and in vivo derangements of monoamine oxidase. *Toxicology*. 1980;18:87-102.
18. Awasthi S BP. Semicarbazide protection from in vivo oxidant injury of vascular tissue by allylamine. *Toxicol Lett*. 1993;66(2):157-63.

19. Kato K, Nakazawa M, Masani F, Izumi T, Shibata A, Imai S. Ethanol ingestion on allylamine-induced experimental subendocardial fibrosis. *Alcohol* (Fayetteville, NY). 1995;12(3):233-9.
20. Z. YOUSEFIPOUR KR, M.A. NEWAZ, S.G. MILTON. MECHANISM OF ACROLEIN-INDUCED VASCULAR TOXICITY. *J Physiol Pharmacol* 2005;56(3):337-53.
21. Perez CM LA, Hazari MS, Haykal-Coates N, Carll AP, Winsett DW, Costa DL, Farraj AK. . Hypoxia Stress Test Reveals Exaggerated Cardiovascular Effects in Hypertensive Rats After Exposure to the Air Pollutant Acrolein. *Toxicol Sci* 2013;132(2):467-77.
22. Taylor NE, Cowley AW. Effect of renal medullary H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on salt-induced hypertension and renal injury. . editor2005 2005-12-01 00:00:00. R1573-R9 p.
23. Boor PJ FV. Ultrastructural alterations in allylamine cardiovascular toxicity. Late myocardial and vascular lesions. *Am J Pathol* 1985;121(1):39-54.
24. Boor PJ SR, Nelson TJ, et al. In vivo metabolism of the cardiovascular toxin, allylamine. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(24):4347-53.
25. Allen W. Cowley Jr DLM, Shanhong Lu, Richard J. Roman. The Renal Medulla and Hypertension. *Hypertension* 1995;25:663-73.
26. Qing Hui Chen GMT. Responses to GABA-A receptor blockade in the hypothalamic PVN are attenuated by local AT1 receptor antagonism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:827-33
27. Oliveira-Marques V CL, Marinho HS, Antunes F. . A quantitative study of NF- $\kappa$ B activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Relevance in inflammation and syn-ergy with TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 2007;178(6):3893-902.

28. Sally E. Purdom-Dickinson EVS, Haipeng Sun, and Qin M. Chen. Translational Control of Nrf2 Protein in Activation of Antioxidant Response by Oxidants. *Mol Pharmacol* 2007;72:1074-81.
29. Liu TH BJ, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol.* 1989;56 H589-H93.
30. Simão S GP, Pinto V, Silva E, Amaral JS, Igreja B, Afonso J, Serrão MP, Pinho MJ, Soares-da-Silva P. Age-related changes in renal expression of oxidant and antioxidant enzymes and oxidative stress markers in male SHR and WKY rats. *Exp Gerontol.* 2011;46(6):468-74.
31. Sousa T, Afonso, J., Carvalho, F., Albino-Teixeira, A Lipid peroxidation and antioxidants in arterial hypertension. In: Catala DA, editor. *Lipid peroxidation* 2012. p. 345-92.
32. van den Berg R HG, van den Berg H, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr.* 2001;86(Suppl. 1):S121-7.
33. Niture SK KR, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med.* 2014;86:36-44.
34. Dinis-Oliveira RJ SC, Remiao F, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML et al. Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate. . *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1017–28.
35. Yen TT PD, Powell CE, Kirschner GL. . Thermal stress elevates the systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats. . *Life Sci* 1978;22:359-62.
36. Ferrari AU DA, Albergati F, Bertoli P, Mancina G. . Intraarterial pressure alterations during tail-cuff blood pressure measurements in normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 1990;8:909-11.

37. Irvine RJ WJ, Chan R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;38(3):157-62.
38. Van Vliet BN CL, Antic V, Schnyder-Candrian S, Montani JP. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44(2):361-73.
39. Jaimes EA, et al. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADP(H) oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004.
40. Catalano CE KR. Inactivation of DNA polymerase alpha-primase by acrolein: loss of activity depends on the DNA substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214(3):971-7.
41. Bui LC MA, Xu X, Duval R, Busi F, Dupret JM, Rodrigues-Lima F, Dairou J. Acrolein, an  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde, irreversibly inhibits the acetylation of aromatic amine xenobiotics by human arylamine N-acetyltransferase 1. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(7):1300-5.
42. JH K. Modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the lipid peroxidation product, acrolein. *BMB Rep*. 2013;46(11):555-60.
43. Sun L. et al. Acrolein is a mitochondrial toxin: Effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Mitochondrion* 2006;6:136–42.
44. Jia L LZ, Sun L, Miller SS, Ames BN, Cotman CW, Liu J. Acrolein, a Toxicant in Cigarette Smoke, Causes Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction in RPE Cells: Protection by (R)- $\alpha$ -Lipoic Acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(1):339-48.
45. STOREY KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29:1715-33.

46. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
47. Zhang C YJ, Jacobs JD, Jennings LK. Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2563-72.
48. Ford D. Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin Lipidol*. 2010;5(6):835-52.
49. Bray RC CS, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1974;139(1):43-8.
50. Hodgson EK FI. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*. 1975;14(24):5294-9.
51. Lardinois OM MM, Rouxhet PG. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1295(2):222-38.
52. Cai H. NAD(P)H Oxidase–Dependent Self-Propagation of Hydrogen Peroxide and Vascular Disease. *Circ Res*. 2005;96:818-22.
53. Rodriguez-Martinez MA G-CE, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved *Br J Pharmacol*. 1998;125:1329–35.
54. Gao YJ LR. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol* 2001;134:1639–46.



55. Gao YJ HS, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003;138(1085–1092).
56. Thakali K DL, Fink GD, Watts SW. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2006;47:482–7.
57. Asghar M BA, Fardoun RZ, Lokhandwala MF Hydrogen peroxide causes uncoupling of dopamine D1-like receptors from G proteins via a mechanism involving protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *Free Radic Biol Med* 2006;40:13–20.
58. Vaziri ND R-IB. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2(10):582-93.
59. Harrison D. The Mosaic Theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. . *J Am Soc Hypertens* 2013;7(1):68–74.
60. Van den Berg R ea. Transcription factor NF-κB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 86, Suppl. 2001;1:S121-S7.
61. Gasparini C FM. NF-κB as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des.* 2012;18(35):5735-45.
62. Brasier AR JM, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000;212:155–69.
63. Shimizu H SS, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. CREB, NF-κB, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(7):C685-92.

64. Fardoun RZ AM, Lokhandwala M Role of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in oxidative stress-induced defective dopamine D1 receptor signaling in the renal proximal tubules of Sprague-Dawley rats. *Free Radic Biol Med* 2007(42):756–64.
65. Li W KT, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong AN. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1485-9.
66. Cuadrado A M-MZ, Ye J, Lastres-Becker I. . Transcription factors NRF2 and nf-kb are coordinated effectors of the RHO family, GTP binding protein rac1 during inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289(22):15244-58.
67. Boomsma F. DFH, van den Meiracker A.H., Man in 't Veld A.J., Schalekamp M.A. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase activity is elevated in diabetes mellitus and correlates with glycosylated haemoglobin. *Clin Sci* 1995;88:675– 9.
68. Garpenstrand H EJ, Bäcklund LB, Orelund L, Rosenqvist U. Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in Type 2 diabetes mellitus complicated by retinopathy. . *Diabet Med* 1999;16:514– 21.
69. Mészáros Z ST, Raimondi L, Karádi I, Romics L, Magyar K. Elevated serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus: correlation with BMI and serum triglyceride. *Metab Clin Exp*. 1999;48:113– 7.
70. Wang YC ea. Serum vascular adhesion protein-1 level is higher in smokers than non-smokers. *Ann Hum Biol*. 2013;40(5):413-8.
71. K. Magyar1 ZM, and P. Mátyus. Semicarbazide-sensitive amine oxidase. Its physiological significance. *Pure Appl Chem*. 2001;73(9):1393-400.

72. Vidrio H MM, Fernández G, Lorenzana-Jiménez M, Campos AE. Enhancement of hydralazine hypotension by low doses of isoniazid. Possible role of semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. *Gen Pharmacol.* 2002;35:195–204.
73. Vidrio Hea. Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Substrates Potentiate Hydralazine Hypotension: Possible Role of Hydrogen Peroxide. *JPET.* 2003;307:497–504.